

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **59222766 A**(43) Date of publication of application: **14.12.84**

(51) Int. Cl

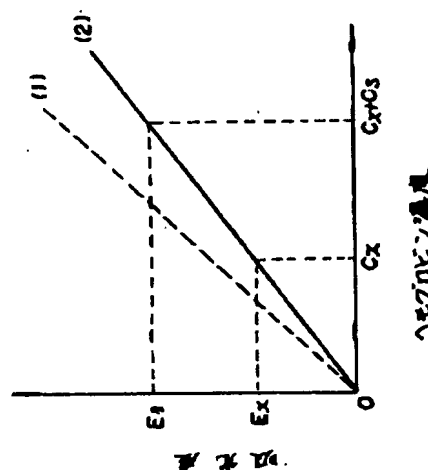
G01N 33/72(21) Application number: **58095673**(71) Applicant: **TERUMO CORP**(22) Date of filing: **01.06.83**(72) Inventor: **TAKARA SHINICHI****(54) QUANTITATIVE ANALYSIS OF HEMOGLOBIN IN HUMOR****(57) Abstract:**

PURPOSE: To enable the quantitative analysis of hemoglobin in humor safe to the human body by eliminating the toxicity of a mutagenic agent, by using tetramethylbenzidine as a color forming reagent.

CONSTITUTION: An aqueous hydrogen peroxide solution is added to an acetic acid solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) while a minute amount (Rpts.vol.) of a body fluid to be examined is added to the resulting solution mixture and, after the obtained reaction mixture is allowed to stand for a definite time at a room temp., a reaction stopping solution such as an acetic acid solution is added to measure the absorbancy E_x of the body fluid to be examined, for example, at 660nm. In the next step, the aqueous hydrogen peroxide solution is added to the acetic acid solution of TMB while a minute amount (Rpts.vol.) of the body fluid to be examined and a hemoglobin standard liquid (Rpts.vol) having a known concn. C_s are added to the resulting solution mixture and, after, the obtained reaction mixture is allowed to stand for a definite time at a room temp., the reaction stopping solution such as acetic acid is added to measure the absorbancy E_s of the standard solution at 660nm. the obtained measured values E_x , E_s and the

known concn. C_s of the hemoglobin standard solution are substituted for a formula $C_x = E_x \times C_s / (E_s - E_x)$ to calculate the hemoglobin conc. C_x in the humor to be examined.

COPYRIGHT: (C)1984,JPO&Japlo



⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—222766

⑪ Int. Cl.³
G 01 N 33/72

識別記号

庁内整理番号
8305—2G

⑬ 公開 昭和59年(1984)12月14日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 体液中のヘモグロビン定量法

川越市岸町2丁目36番8号

⑮ 特 願 昭58—95673

⑯ 出 願 昭58(1983)6月1日

⑰ 発 明 者 高良真一

⑱ 出 願 人 テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番
1号

⑲ 代 理 人 弁理士 西村公佑

明 細 書

1. 発明の名称

体液中のヘモグロビン定量法

2. 特許請求の範囲

(1) 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を含む溶液に微量の被検体液 (R 容量部) を加え、一定時間放置後反応停止液を加え、該溶液の吸光度 E_x を測定し、他方、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を含む溶液に微量の被検体液 (R 容量部) および既知濃度 C_s を有するヘモグロビン標準液 (R 容量部) を加え、一定時間放置後反応停止液を加え、該溶液の吸光度 E_s を測定し、次の式から被検体液中のヘモグロビン濃度 C_x を算出することを特徴とする体液中のヘモグロビン定量方法。

$$C_x = \frac{E_x}{E_s - E_x} \times C_s$$

(2) 前記 3, 3', 5, 5'-テトラメチル

ベンジジンおよび過酸化水素を含む溶液が酢酸の溶液であり、前記反応停止液が酢酸溶液である特許請求の範囲第1項記載の体液中のヘモグロビン定量法。

(3) 吸光度の測定波長が660nmである特許請求の範囲第1項または第2項記載の体液中のヘモグロビン定量法。

3. 発明の詳細な説明

I. 発明の背景

技術分野

本発明は、血漿、血清や尿などの体液中に存在するヘモグロビンの改良された定量法に関するものである。

血液は血液循環器具等と接触した際赤血球が破壊されて溶血する可能性がある。そこでこれら血液と直に接する医療器具においてはできるだけ溶血を起させないことが要求される。溶血の程度は血漿中のヘモグロビンを定量することにより判定され、上記医療器具製品の品質評価の指標とされる。従って本発明の定量法は医療器具製品の品質

評価等に利用される。

先行技術および問題点

体液中の微量のヘモグロビンは、ヘモグロビンのもつペルオキシダーゼ様活性（過酸化水素を水と酸素に分解する反応を促進する作用）を測定することにより定量される。ペルオキシダーゼ様活性の測定には還元性発色試薬が用いられるがこの発色試薬として従来ベンジジンやオートリジン等が使用されてきた。しかし、ベンジジンには変異原性があり現在製造・販売が禁止されており、またオートリジンにも同様に変異原性があり、さらに発色に時間がかかる欠点を有する。これらの問題を解決する方法としてスタンデファ（standeferr）は3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（以下TMBと称することがある。）を用いる方法を提案している（Clinical Chemistry, Vol. 23, No. 4, p. 749 ~ 751, 1977）。

スタンデファ等の方法によれば、血漿中のヘモグロビンは以下の操作により測定される。

(A) ブランクの吸光度 E'_{0} の測定

$$C'_{x} = \frac{E'_{x} - E'_{0}}{E'_{s} - E'_{0}} \times C'_{s}$$

上記のスタンデファ等の方法は、過酸化水素溶液に被検血漿を加えて37℃で不活化処理を行う点に特徴を有する。この操作を行うと被検血漿中のヘモグロビンはペルオキシダーゼ様活性を失うため、これに既知量のヘモグロビンを加えることによって被検血漿と等しい発色阻害活性をもちさらに既知量のヘモグロビンを含むスタンダードが得られる。

スタンデファ等の方法は安全な発色試薬を使用する点で優れているが、反面、血漿のペルオキシダーゼ阻害作用の補正に不活化処理を採用しているため、操作が複雑で所要時間が長く、誤差の入り込む機会が多い。また後に詳述する如く、ペルオキシダーゼ阻害作用の補正法が不完全で測定結果が期待される値よりやや高い値を示すという欠点を有する。さらに、スタンデファ等は、不活化処理を行なうブランクとスタンダードには0.5

過酸化水素溶液に被検血漿を加えて37℃に保持し、ヘモグロビンのペルオキシダーゼ様活性を失格させる（以下、この操作を不活化処理という）。これにTMB溶液を加えて室温で反応させ、酢酸を加えた後660nmでブランクの吸光度 E'_{0} を測定する。

(B) スタンダードの吸光度 E'_{s} の測定

過酸化水素溶液に被検血漿を加えて37℃で不活化処理し、これにTMB溶液および既知濃度 C'_{s} のヘモグロビンを加え、室温で反応させ、酢酸を加えた後660nmでスタンダードの吸光度 E'_{s} を測定する。

(C) サンプルの吸光度 E'_{x} の測定

過酸化水素溶液を37℃下に保持し、これにTMB溶液および被検血漿を加え、室温で反応させ、酢酸を加えた後660nmでサンプルの吸光度 E'_{x} を測定する。被検血漿中のヘモグロビン濃度 C'_{x} を次の式から算出する。

%の過酸化水素溶液を使用し、不活化処理を行わないサンプルには0.1%の過酸化水素溶液を使用しており、これは不活化処理によって過酸化水素が分解されその濃度が低下することを考慮して不活化処理を行わないサンプルの過酸化水素の濃度を低くしたものと思われる。ところが、検体中の過酸化水素濃度が変わると、TMBの発色は複雑に変化し、過酸化水素の分解の程度によって測定結果が真の値よりも高くなったり低くなったりする可能性がある。

11. 発明の目的

そこで本発明の目的は上記の欠点のない体液中のヘモグロビン定量法を提供することにある。

即ち、本発明は、安全な発色試薬を用いる体液中のヘモグロビン定量法を提供することを目的とする。本発明は、さらに不活化処理を必要とせず、操作が簡便な体液中のヘモグロビン定量法を提供することを目的とする。

本発明はさらに、正確な測定値を与える体液中のヘモグロビン定量法を提供することを目的とする。

る。

上記の目的を達成するために、本発明は以下の構成からなる。

(1) 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を含む溶液に微量の被検体液(R容量部)を加え、一定時間放置後反応停止液を加え、該溶液の吸光度 E_x を測定し、他方、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を含む溶液に微量の被検体液(R容量部)および既知濃度 C_s を有するヘモグロビン標準液(R容量部)を加え、一定時間放置後反応停止液を加え、該溶液の吸光度 E_s を測定し、次の式から被検体液中のヘモグロビン濃度 C_x を算出することを特徴とする体液中のヘモグロビンの定量法。

$$C_x = \frac{E_x}{E_s - E_x} \times C_s$$

(2) 前記3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を含む溶液が酢酸の

TMB溶液と反応させた場合の吸光度を E_x 、微量の被検体液に既知濃度 C_s を有するヘモグロビン標準溶液を加えたものと過酸化水素溶液およびTMB溶液とを反応させたものの吸光度を E_s とすると、第1図から明らかなように、検量線の傾きは $\frac{E_s - E_x}{C_s}$ となる。

これより被検体液中のヘモグロビン濃度 C_x は、次の式で求められる。

$$E_x = \frac{E_s - E_x}{C_s} \times C_x$$

$$C_x = \frac{E_x}{E_s - E_x} \times C_s$$

尚、被検体液の吸光度 E_x を測定する際に、厳密に言えば次に用いるヘモグロビン標準液と同量のブランク(例えば水)を試料に加えるべきであるが、この量は、微量であり、TMB溶液、過酸化水素溶液、反応停止液等他の試薬の量に比べて

溶液であり、前記反応停止液が酢酸溶液である第1項記載の体液中のヘモグロビン定量法。

(3) 吸光度の測定波長が660nmである第1項または第2項記載の体液中のヘモグロビン定量法。

Ⅲ. 発明の具体的説明

血漿等の体液にはヘモグロビンのペルオキシダーゼ様活性を阻害する作用があるため、ヘモグロビン水溶液でつくった検量線を体液中のヘモグロビン定量に適用することはできない。そこで本発明の方法は、既知濃度のヘモグロビンを加えた被検体液とこれを加えなかった被検体液との吸光度の差から被検体液中のヘモグロビンを定量する。第1図に本発明の方法の原理を説明するための模式図を示す。ヘモグロビン水溶液を用いて検量線を作成すると、第1図の破線(1)のようになるが、体液中では体液のペルオキシダーゼ活性阻害作用のため、この直線より傾きの小さな実線(2)で示すような検量線になる。

いま、微量の被検体液を過酸化水素溶液および

極めて小さいので上記のブランクを加えなくても E_x の測定結果に実質的な影響を与えない。

本発明の方法を実施するには、まず被検体液の吸光度 E_x を測定する。即ち、TMBの酢酸溶液に過酸化水素の水溶液を加え、これに微量の被検体液(R容量部)を加え、室温で一定時間放置した後酢酸溶液のような反応停止液を加え660nmで被検体液の吸光度 E_x を測定する。次に標準液の吸光度 E_s を測定する。即ち、TMBの酢酸溶液に過酸化水素の水溶液を加え、この溶液に微量の被検体液(R容量部)および既知濃度 C_s を有するヘモグロビン標準液(R容量部)を加え、室温に一定時間放置した後酢酸のような反応停止液を加え、660nmで標準液の吸光度 E_s を測定する。得られた測定値 E_x および E_s およびヘモグロビン標準液の既知濃度 C_s を前記式に代入して被検体液中のヘモグロビン濃度を算出する。

本発明の定量法が適用される検体としては、血漿、血清、リンパ液、腹水、尿等の体液があげられる。

次に実施例を示して本発明の方法をさらに具体的に説明する。

実施例

ヘパリンを添加した牛血を生理食塩水で希釈してヘマトリット値を20%に調整し、3mlずつ塩化ビニル樹脂製血液保存バッグに分注した。

血液保存バッグ全体を37℃の恒温水槽内に沈め、バッグに接続してあるチューブにより血液循環回路を形成し、この回路中に供試ポンプを接続した。回路の全長は230cmとした。

またポンプチューブの部分は供試ポンプに適合するものを使用した。血液が37℃に達した時点で供試ポンプの運転を開始した。流速は200ml/minとした。

ポンプ運転開始直前、1時間後、3時間後、6時間後にそれぞれ血液回路中に設けられたサンプリングポートより採血し、1200G、10分間遠心分離して得た血漿中のヘモグロビン量を下記の如くして定量した。

TMB 1gを90% (v/v) 酢酸 1000ml

に溶かす。このTMB溶液1mlに0.5%過酸化水素水溶液1mlを加え次いで被検血漿20μlを加えた。この溶液を室温で20分間放置し、10% (v/v) 酢酸 10mlを加えた後、660nmで吸光度を測定した。他方TMB溶液1mlに0.5%過酸化水素水溶液1mlを加えた溶液に被検血漿20μlおよびヘモグロビン濃度20mg/dlのヘモグロビン標準水溶液20μlを加え、室温に20分間放置した後10% (v/v) 酢酸 10mlを加え、660nmで吸光度を測定した。上記の測定で得られた吸光度から被検血漿中のヘモグロビン濃度を算出した。

コントロールとして血液循環を行わず恒温水槽内に沈めただけの血液保存バッグからも同様に採血して血漿ヘモグロビンを定量した。

3種類のポンプA、B、Cについて同時に行なった測定の結果を表1に示す。表1から、ポンプAが最も赤血球の損傷が少なく、次いでポンプBであり、ポンプCはかなり損傷を与えており、医療器具製品としての品質が劣っていることを示

している。

表 1

血漿ヘモグロビン定量結果

(単位 mg/dl)

時間(分)	0	1	3	6
被検血漿				
ポンプ A	12.6	12.9	13.8	15.3
ポンプ B	13.2	13.2	16.6	22.0
ポンプ C	13.7	18.9	29.2	45.2
コントロール	12.6	12.8	11.8	12.0

IV. 発明の作用効果

本発明の方法によれば、第1に、安全な発色試薬を用いる体液中のヘモグロビン定量法が提供される。即ち、本発明においては発色試薬として3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを使用するが、このものには変異原性等の毒性がなく、人体に対して安全である。

本発明の方法によれば、第2に、正確な体液中のヘモグロビン定量法が提供される。

即ち、ヘモグロビンを含まない同一の血漿に既知量のヘモグロビンを加えてつくったサンプルを本発明の方法と、スタンデファ等の従来法とでそれぞれ定量し、その結果を第2図に示す。第2図は、横軸に、加えたヘモグロビン量を取り、縦軸に測定したヘモグロビン量をとったものである。定量法が完全であれば傾き1の直線となるはずである。本発明の定量法においては傾きが略1の直線(3)となったのに対して、スタンデファ等の方法においては傾き約1.2の直線(4)となり、20%もの高値を示した。

この結果からも、本発明の定量法は、血漿のもつペルオキシダーゼ様活性阻害の補正に関してスタンデファ等の方法より優れており、より正確な定量法であることが明らかであろう。

さらに本発明によれば、第3に、操作が簡便な体液中のヘモグロビンの定量法が提供される。

本発明の方法においては不活化処理を行わず、またブランクのような補正用の検体を必要としないので測定操作がより単純化され、所要時間も短縮されるので、より迅速な測定が可能である。

4. 図面の簡便な説明

第1図は、本発明の体液中のヘモグロビン定量法の原理を示す模式図である。

第2図は、血漿ヘモグロビンの定量結果を示すグラフである。

特許出願人

テルモ株式会社

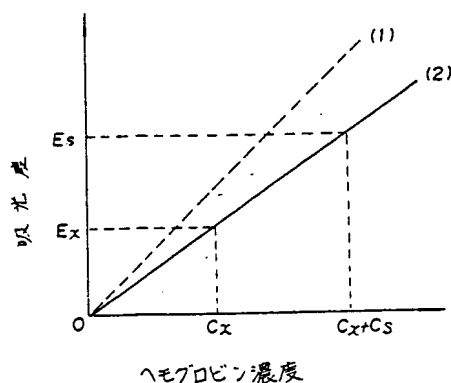
代理人

弁理士

西村 公



第1図



第2図

